

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-009281

(43)Date of publication of application : 19.01.1999

(51)Int.Cl. C12N 15/09
C12Q 1/04
C12Q 1/68

(21)Application number : 09-169753

(71)Applicant : SHIMADZU CORP

(22)Date of filing : 26.06.1997

(72)Inventor : FUKUSHIMA SHIGERU

(54) OLIGONUCLEOTIDE FOR DETECTING BACTERIA AND PROCESS UTILIZING THE SAME

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain new oligonucleotides having sequences complementary to nucleic acid sequences encoding verocytotoxins produced by enterohemorrhagic Escherichia coli, Verocytotoxin-producing Escherichia coli, etc., detecting verocytotoxins used for clinical examination of food poisoning, diarrhea, etc.

SOLUTION: The new chemically synthesized oligonucleotides have sequences expressed by formula I-IV having nucleotides sequences complementary to the targeting nucleotide sequence encoding genes of type 1 verocytotoxin(VT1) and type 2 verocytotoxin(VT2) produced by enterohemorrhagic Escherichia coli(EHEC), Verocytotoxin-producing Escherichia coli(VTEC), and their variational gene existing in the sample, or oligonucleotides having relating complementary sequences, useful for clinical examination, especially in examination relating to food poisoning, diarrhea, etc., simply, rapidly, in high sensitivity in examination of EHEC, VTEC. The oligonucleotide is obtained by selecting base sequence from the gene of verocytotoxin of EHEC(VTEC) and synthesizing.

(5') d-CAACACTGGATGATCTGAG-(3')

I.

(5') d-CCUCCGCAAGTGCCTAATA-(3')

II.

(6') d-ATCAGTCGTCACTCACTGGT-(3')

III.

(6') d-CTGGTGTGCACAGTGACAAA-(3')

IV.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 11.05.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 04.06.2002

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-9281

(43) 公開日 平成11年(1999) 1月19日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	F I
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 Q 1/04		C 1 2 Q 1/04
1/68		1/68 A

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願平9-169753

(22) 出願日 平成9年(1997) 6月26日

(71) 出願人 000001993

株式会社島津製作所

京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地

(72) 発明者 福島 繁

京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会

社島津製作所三条工場内

(74) 代理人 弁理士 西岡 義明

(54) 【発明の名称】 細菌検出のためのオリゴヌクレオチドおよびそれを用いた検出法

(57) 【要約】

【課題】 臨床検査、とりわけ食中毒・下痢症にかかる検査における、簡便、迅速、かつ高感度なEHEC (VTEC) の検査法を提供する。

【解決手段】 本発明は、EHEC (VTEC) のVT1遺伝子およびVT2遺伝子に選択的にハイブリダイズする配列番号1~4のオリゴヌクレオチドを作製し、このオリゴヌクレオチドをプライマーとして遺伝子増幅に用い、本菌の病原因子であるVT1またはVT2のどちらか一方のみを産生する菌、もしくはVT1とVT2の両方を産生する菌のみを選択的に検出することを特徴としている。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 検体中に存在する腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*、以下、EHEC) またはベロ毒素産生性大腸菌 (Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*、以下、VTEC) の産生するベロ毒素1型 (以下、VT1) の遺伝子 (以下、VT1遺伝子) およびベロ毒素2型 (以下、VT2) の遺伝子 (以

下、VT2遺伝子) とその変異型遺伝子 (VT2vha, VT2vhb, VT2vp1, およびVT2vp2) をコードするヌクレオチド配列を標的とし、そのヌクレオチド配列と相補的となるように化学合成されたオリゴヌクレオチドであって、合成ヌクレオチドが以下の配列群、

(5') d-CAACACTGGATGATCTCAG-(3')
 .. (a、配列番号1)
 (5') d-CCCCCTCAACTGCTAATA-(3')
 .. (b、配列番号2)
 (5') d-ATCAGTCGTCACTCACTGGT-(3')
 .. (c、配列番号3)
 (5') d-CTGCTGTCACAGTGACAAA-(3')
 .. (d、配列番号4)

または対応する相補的配列からなることを特徴とするオリゴヌクレオチド。

【請求項2】 請求項第1項に記載された各配列を有するオリゴヌクレオチドを鎖長反応のプライマーとして機能させ、標的ヌクレオチド配列を選択的に増幅させることを特徴とする方法であって、

- (a) 検体中の1本鎖状態の標的ヌクレオチド配列にプライマーをハイブリダイズさせ、4種のヌクレオチドの重合反応により鎖長反応を行わせ、
- (b) 得られた2本鎖の標的ヌクレオチド配列を1本鎖に分離した場合、その相補鎖は他方のプライマーによる鎖長反応の鋳型として機能し、
- (c) これら2種のプライマーによるハイブリダイゼーションを繰り返すことにより、特定のヌクレオチド配列が増幅され、電気泳動、またはクロマトグラフィーで増幅されたヌクレオチド断片を検出し、
- (d) その結果、前記検体中に認識されるべき配列が存在しているか否かを判定することでEHECまたはVTECの検出、ベロ毒素遺伝子の型別を行う方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、臨床検査、とりわけ食中毒検査もしくは下痢症検査におけるEHECまたはVTEC、およびVT1遺伝子とVT2遺伝子の検出に関するものである。

【0002】

【従来技術】 EHECまたはVTECは、出血性大腸炎に代表される食中毒症状のみでなく、重篤な疾患である溶血性尿毒症症候群 (hemolytic uremic syndrome) の原因菌でもることが認められ、近年、臨床検査では、本菌の迅速な検出が重要視されつつある。

【0003】 EHEC (VTEC) にかかる検査では、検査材料は患者の糞便、食品、または患者の周辺環境から採取された水 (飲料水、河川水等) である。これらの検体からEHEC (VTEC) を検出し、同定しようと

する場合、直接分離培養、一次確認培養試験、二次確認培養試験を経て抗血清による凝集反応試験に至る操作を行う必要がある。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 ところが、これらの培養段階に要する時間は、それぞれ18〜24時間であり、総所要時間になると3〜4日となり、非常に長時間である。EHEC (VTEC) の血清型としては、現在、O157:H7が代表的であるが、EHEC (VTEC) の起病性はベロ毒素の産生能に由来しており、血清型と起病性とは必ずしも一致するものではない。したがって、血清型による同定だけでは起病菌としての判定に困難が生じる場合が多い。このような理由から、現在のEHEC (VTEC) 検査法は、迅速性および簡便性に欠け、実効的でない。

【0005】 そこで、本発明は、オリゴヌクレオチドを核酸合成反応のプライマーとして機能させる遺伝子増幅技術により、EHEC (VTEC) のVT1遺伝子およびVT2遺伝子を検出するもので、臨床検査、とりわけ食中毒・下痢症にかかる検査における、簡便、迅速、かつ高感度なEHEC (VTEC) の検査法を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明は、EHEC (VTEC) のVT1遺伝子およびVT2遺伝子に選択的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを作製し、このオリゴヌクレオチドをプライマーとして遺伝子増幅に用い、本菌の病原因子であるVT1またはVT2のどちらか一方のみを産生する菌、もしくはVT1とVT2の両方を産生する菌のみを選択的に検出することを特徴としている。

【0007】 ここで、オリゴヌクレオチドは、VT1遺伝子およびVT2の遺伝子とその変異型遺伝子 (VT2vha, VT2vhb, VT2vp1, およびVT2vp2) をコードするヌクレオチド配列を標的とし、その

ヌクレオチド配列と相補的となるように化学合成されたオリゴヌクレオチドであって、合成ヌクレオチドが以下

(5') d-CAACACTGGATGATCTCAG-(3')
 .. (a、配列番号1)
 (5') d-CCCCCTCAACTGCTAATA-(3')
 .. (b、配列番号2)
 (5') d-ATCAGTTCGTCACTCACTGGT-(3')
 .. (c、配列番号3)
 (5') d-CTGCTGTACACAGTGACAAA-(3')
 .. (d、配列番号4)

または対応する相補的配列からなることを特徴とする。

【0008】なお、遺伝子増幅は、Saiki らが開発した Polymerase Chain Reaction 法（以下、PCR法と略する；Science 230, 1350(1985)）をもとに行っている。この方法は、ある特定のヌクレオチド配列領域（本発明の場合は、EHECまたはVTECのVT1遺伝子およびVT2遺伝子において、ほぼ共通な塩基配列を有する領域）を検出する場合、その領域の両端の一方は+鎖を、他方は-鎖をそれぞれ認識してハイブリダイゼーションするようなオリゴヌクレオチドを用意し、それを熱変性により1本鎖状態にした試料核酸に対し、鋳型依存性ヌクレオチド重合反応のプライマーとして機能させ、生成した2本鎖核酸を再び1本鎖に分離し、再び同様な反応を起こさせる。この一連の操作を繰り返すことで、2つのプライマーに挟まれた領域は検出できるまでにコピー数が増大してくる。

【0009】検体としては、臨床検査材料、例えば、糞便、尿、血液、組織ホモジネートなど、また、食品材料でもよい。これら材料をPCRの試料としてもちいるには、材料中に存在する菌体から核酸成分を遊離させる操作が前処理として必要となる。しかし、プライマーがハイブリダイズできる核酸が数分子から数十分子以上存在すればPCRは進むので、検査材料を溶菌酵素、界面活性剤、アルカリ等で短時間処理するだけでPCRを進行させるに十分な核酸量を持った試料液が調製できる。

【0010】本発明でプライマーとして用いられるオリゴヌクレオチドは、選択性や検出感度および再現性から考えて、10塩基以上、望ましくは15塩基以上の長さを持ったヌクレオチド断片で、化学合成あるいは天然のどちらでもよい。また、プライマーは、特に検出用として標識されていなくてもよい。プライマーが規定しているEHEC(VTEC)のVT1遺伝子およびVT2遺伝子のヌクレオチド配列における増幅領域は、50塩基から2,000塩基、望ましくは、100塩基から1,000塩基となればよい。

【0011】鋳型依存性ヌクレオチド重合反応には、耐熱性DNAポリメラーゼを用いているが、この酵素の起源については90～95℃の温度で活性を保持していれば、どの生物種由来でもよい。熱変性の温度は90～95℃、プライマーをハイブリダイズさせるアニーリング

の配列群、

操作の温度は37～65℃、重合反応は50～75℃で、これを1サイクルとしたPCRを20から42サイクル行つて増幅させる。検出は、PCRを終えた反応液をそのままアガロースゲル電気泳動にかけることで、増幅されたヌクレオチド断片の存在、およびその長さを確認できる。その結果から検体中にプライマーが認識すべき配列を持ったヌクレオチドが存在しているかどうか判定することができる。この判定は、そのままVT1遺伝子またはVT2遺伝子、またはその両遺伝子をもつEHEC(VTEC)菌の有無を判定するものとなる。増幅されたヌクレオチド断片の検出には、その他の電気泳動法やクロマトグラフィー、臭化エチジウムによる核酸染色も有効である。

【0012】

【実施例】

(実施例1)

検体の調製

使用したEHEC(VTEC)は、患者等から由来したもので、総計320株を用いた。各菌株をLB培地(1%トリプトン、0.5%イーストエキストラクト、および1%塩化ナトリウムに接種し、37℃、好氣的条件下で、終夜振とう培養を行った。各菌株培養液を10mM トリス-塩酸緩衝液pH7.5(以下TE緩衝液)で10倍に希釈し、95℃で10分間の加熱処理を行った後、これらを遠心し、その上清を検体とした。

【0013】プライマーの合成

下記の文献に記載されたEHEC(VTEC)のVT1遺伝子およびVT2遺伝子の塩基配列から、請求項1に示した各配列を選び、それと同じ配列を持つオリゴヌクレオチドを化学合成した。化学合成は、サイクロンプラスDNA合成装置(ミリジェン/バイオリサーチ社製)を用い、β-シアノエチルフォスホアミダイト法により行った。合成したオリゴヌクレオチドの精製はC18逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーで行った。

【0014】文献：Takao, T. et al., Microb. Pathog. g., 5:357-369, 1988

Jackson, M. P. et al., FEMS Microbio. Lett., 44:109-114, 1987

Ito, H., et al., Microb. Pathog., 8:47-60, 1990

Weinstein, D. L., J. Bacteriol., 170:4223-4230, 19

88

PCR

前記検体液 3 μ l を用い、それに滅菌蒸留水 17.05 μ l、10x 反応用緩衝液 3 μ l、dNTP 溶液 4.8 μ l、プライマー(1) 1.0 μ l、プライマー(2) 1.0 μ l、および耐熱性 DNA ポリメラーゼ 0.15 μ l を加えて、全量 30 μ l の反応液を調製した。この反応液の入った容器にミネラルオイル (SIGMA 社製) を 50 μ l 加え、反応液上に重層した。各使用した溶液の内容、およびプライマー(1) と(2) の組合せは、次のとおりである。

【0015】10x 反応用緩衝液: 500mM KCl, 100mM Tris-HCl pH8.3, 15mM MgCl₂

0.1%(w/v)ゼラチン

dNTP 溶液: dATP, dCTP, dGTP, dTTP を混合させたもので各終濃度が 1.25mM

プライマー: 請求項(1)に前述した4種のオリゴヌクレオチド化学合成精製品の水溶液(濃度 3.75 OD/ml)を等量混合して使用した。

【0016】耐熱性 DNA ポリメラーゼ: Taq DNA ポリメラーゼ (5 unit/ml; Perkin Elmer Cetus 社製) 反応条件は、次のとおりである。

【0017】熱変性: 94℃、1分

アニーリング: 55℃、

重合反応: 72℃、1分

熱変性からアニーリングを経て、重合反応に至る過程を 1 サイクル(所要時間 5.7 分)とし、これを 35 サイクル(総所要時間約 3 時間)行った。これらの操作は、DNA サーマルサイクラー (Perkin Elmer Cetus 社製) に上記反応条件をプログラムして行った。

【0018】検出

反応液から増幅されたヌクレオチド断片を検出するため、アガロースゲル電気泳動を以下のように行った。アガロースゲルはゲル濃度 3% (w/v) とし、臭化エチジウム (0.5 μ l/ml) を含むものを用いた。泳動の条件は定電圧 100V、30分で行った。操作方法ならびに他の条件は、Maniatis 等著 Molecular Cloning 第2版

(1989) に記載されている技法で行った。反応液の他に分子量マーカーの泳動も同時に行い、相対移動度の比較によりヌクレオチド断片の長さを算出した。

【0019】コロニーハイブリダイゼーション試験

VT1 遺伝子または VT2 遺伝子に特異的なオリゴヌクレオチドプローブをそれぞれ用いて、Grunstein の方法 (Grunstein, M. and Hogness, D., Proc. Natl. Acad. Sci. 72, 3961 (1975)) にしたがって行った。

【0020】結果

前述したように EHEC (VTEC) の VT1 遺伝子および VT2 遺伝子は、すでに塩基配列が決定されており、本発明のオリゴヌクレオチド、すなわち、プライマーが PCR により増幅させるヌクレオチドの大きさは容易に推定できる。それによるとプライマー(a: 配列番号 1) と(b: 配列番号 2) の組合せでは、349 塩基(または 349 塩基対)の長さのヌクレオチドが増幅されてくるはずである。同様に、プライマー(c: 配列番号 3) と(d: 配列番号 4) の組合せでは、112 塩基(または 112 塩基対)の長さのヌクレオチドが増幅されるはずである。これらの推定値と PCR 法によって実際に増幅されたヌクレオチドの長さが一致した場合、このプライマーの組合せは、VT1 遺伝子または VT2 遺伝子の標的としている領域を正しく増幅しており、かつ、当該菌株は VT1 遺伝子または VT2 遺伝子を有していると判断した。

【0021】被験菌株 320 株で調べた結果を表 1 に示す。各プライマーの組合せは、コロニーハイブリダイゼーション試験で、VT1 遺伝子または VT2 遺伝子を有すると判断された菌株 DNA のみを増幅し、VT1 遺伝子および VT2 遺伝子の両方をもたない菌株の DNA とは全く反応しなかった。すなわち、VT1 遺伝子または VT2 遺伝子を正しく増幅し、VT1 遺伝子または VT2 遺伝子、もしくはその両方の遺伝子をもつ EHEC (VTEC) を正確に検出していることを示している。

【0022】

【表 1】

プライマーの性能比較

			コリー・ハイブリダイゼーション試験による V T 遺伝子の有無			
			V T 1 (有) V T 2 (無)	V T 1 (無) V T 2 (有)	V T 1 (有) V T 2 (有)	V T 1 (無) V T 2 (無)
P C R の 結 果	増 幅 D N A の 大 き さ	3 4 9 (塩基対) のみ	3 9	0	0	0
		1 1 2 (塩基対) のみ	0	1 8 5	0	0
		3 4 9 (塩基対) および 1 1 2 (塩基対)	0	0	5 2	0
		増幅 DNA なし	0	0	0	4 4

(実施例 2) 実施例 1 で得られた結果が V T 1 遺伝子または V T 2 遺伝子をもつ E H E C (V T E C) に対して、選択的なものかどうかを確かめるため、臨床検査において検査対象となる、E H E C (V T E C) 以外の下痢症菌等の遺伝子について本発明のプライマーが反応するかどうかを調べた。方法は検体の調製法を除いて、実施例 1 で示したものと同一である。

【0023】 検体の調製

表 2 中に示した各菌株をそれぞれ適当な増菌培地に接種し、37℃、好氣的、または嫌氣的条件下で終夜培養を行った(このうち嫌氣的条件下で培養した菌株は、*Clostridium perfringens*、*Campylobacter jejuni*、*Bacteroides fragilis*、*Bacteroides vulgatus*、および *Lactobacillus acidophilus* である)。各菌株培養液 0.5 ml から遠心操作により、菌体を回収し、T E 緩衝液で菌体を 1 回洗浄した。この菌体に 50 mM リン酸緩衝液 pH 7.5 に溶解した N-アセチルムラミダーゼ溶液、およびアクロモペプチダーゼ溶液を各終濃度が 50 μg/ml、および 1 mg/ml となるように加え、37℃で 10 分間処理し、溶菌した。T E 緩衝液飽和でさせたフェノールおよびクロロホルムからなる混合液(混合比 1:1)を溶菌液に加えて、よく攪拌した。遠心後、上層液を回収し、エタノール処理を行って、核酸成分を沈澱させた。この沈澱物を 1 ml の T E 緩衝液に溶かして検体とした。また、ヒト胎盤由来 DNA (Human placenta DNA) は、1 μg/ml の濃度のものを調製し、こ

れも同様に P C R を行わせた。

【0024】 結果

表 2 に一部のプライマーの組合せにおける試験結果を示す。表中のプライマーの全ての組合せは、一部の赤痢菌 (*Shigella dysenteriae* type I) の DNA を除いて、下痢症菌 DNA をはじめとする種々の DNA について、それらの DNA を増幅することはなかった。また、*Shigella dysenteriae* type I が V T 1 遺伝子を有しており、V T 1 遺伝子の有無のみでは、E H E C (V T E C) と *Shigella dysenteriae* type I との鑑別が不可能なことは、学界で周知である。したがって、本発明のオリゴヌクレオチド、すなわちプライマーは、V T 1 遺伝子または V T 2 遺伝子を有する菌にのみ、選択的に反応するものと断言できる。なお、本発明の実施例で用いているアガロースゲル電気泳動法を前述の条件で行えば、100 塩基(または 100 塩基対)以下の長さのヌクレオチドであれば、5 から 10 塩基(塩基対)、また、100 から 500 塩基(塩基対)の範囲のヌクレオチドであれば、10 から 20 塩基(塩基対)のヌクレオチドの長さの違いを区別可能である。さらに、アクリルアミドなどをゲル材に用いることで、ヌクレオチドの長さの測定精度を向上させることができ、V T 1 遺伝子および V T 2 遺伝子の選択的検出における信頼度は、さらに高まるものと考えられる。

【0025】

【表 2】

プライマーの特異性

Organism	P C R の試験結果 (4種の混合プライマーによる)
<i>Escherichia coli</i> JCM 1649*	—
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	—
<i>Bacillus subtilis</i> JCM 1465	—
<i>Staphylococcus aureus</i> JCM 2413	—
<i>Staphylococcus epidermidis</i> JCM 2414	—
<i>Salmonella typhimurium</i> IFO 12529	—
<i>Salmonella enteritidis</i> IFO 3163	—
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 12917	—
<i>Vibrio cholerae</i> ATCC 25872	—
<i>Vibrio cholerae</i> type Ogawa ATCC 9458	—
<i>Vibrio cholerae</i> type Inaba ATCC 9459	—
<i>Vibrio fluvialis</i> JCM 3752	—
<i>Campylobacter jejuni</i> JCM 2013	—
<i>Campylobacter coli</i> JCM 2529	—
<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 9610	—
<i>Shigella dysenteriae</i> ATCC 9361	—
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 29903	—
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 29930	—
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 23745	—
<i>Bacteroides vulgatus</i> JCM 5826	—
<i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803	—
<i>Klebsiella pneumoniae</i> JCM 1662	—
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906	—
<i>Proteus vulgaris</i> JCM 1668	—
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 33128	—
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 12344	—
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 33400	—
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 33391	—
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC 19424	—
<i>Neisseria meningitidis</i> ATCC 13077	—
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	—
<i>Lactobacillus acidophilus</i> JCM 1132	—
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> JCM 1275	—
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586	—
<i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 6919	—
<i>Veillonella atypica</i> ATCC 17744	—
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 12689	—
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> JCM 1310	—
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> ATCC 27337	—

* 1 : ペロ毒素遺伝子をもたない菌株であることをPCR-Hybridization試験で確認。

【0026】

【発明の効果】本発明では、PCR法を用いたこと、およびEHEC (VTEC) の病原因子であるVT1およびVT2の各遺伝子 (VT1遺伝子およびVT2遺伝子) を標的とするプライマーを用いたことにより、VT1遺伝子またはVT2遺伝子、もしくはその両方の遺伝子を有する菌の検出において、遺伝子増幅作用による高い検出感度と、2つ、あるいは、それ以上の数のプライマーで反応が規定されることによる高い選択性が得られる。また、検出感度が高いので、多量の検体を必要とせず、検体の前処理も簡便で済む。本発明における実施

例では、反応時間3時間、検出にかかる操作が30分であった。そのうえ、検出にアガロースゲル電気泳動法と臭化エチジウムによる核酸染色法を用いることで、プライマー等を標識せずに検出が行える。しかも増幅されたヌクレオチドの長さを確認できるので、試験結果の信頼性は高いものとなる。

【0027】EHEC (VTEC) の検査には、発見患者の迅速・適切な治療および防疫措置のために、遅滞のない正確な結果が要求される。また、本発明は、EHEC (VTEC) の病原因子であるVT1またはVT2をコードしている遺伝子 (VT1遺伝子およびVT2遺伝

11

子)を選択的に検出するものである。したがって、本発明により、起因菌としてのEHEC(VTEC)の検出を正確に行うことが可能となる。

【0028】

【配列表】

配列番号(SEQ ID NO); 1

配列の長さ 19塩基

配列の型 核酸

配列

CAACACTGGATGATCTCAG

【0029】配列番号(SEQ ID NO); 2

配列の長さ 18塩基

配列の型 核酸

鎖の数 一本鎖

トポロジー 直鎖状

配列

CCCCCTCAACTGCTAATA

【0030】配列番号(SEQ ID NO); 3

配列の長さ 20塩基

配列の型 核酸

鎖の数 一本鎖

トポロジー 直鎖状

配列

ATCAGTCGTCACACTCACTGGT

【0031】配列番号(SEQ ID NO); 4

配列の長さ 19塩基

配列の型 核酸

鎖の数 一本鎖

トポロジー 直鎖状

配列

CTGCTGTCACAGTGACAAA

12

鎖の数

一本鎖

トポロジー

直鎖状

配列の種類

Genomic DNA

ハイボセティカル配列

NO

アンチセンス

NO

起源

Escherichia coli

配列の特徴

特徴を決定した方法 S

10 配列の種類

Genomic DNA

ハイボセティカル配列

NO

アンチセンス

NO

起源

Escherichia coli

配列の特徴

特徴を決定した方法 S

配列の種類

Genomic DNA

ハイボセティカル配列

NO

アンチセンス

NO

起源

Escherichia coli

20 配列の特徴

特徴を決定した方法 S

配列の種類

Genomic DNA

ハイボセティカル配列

NO

アンチセンス

NO

起源

Escherichia coli

配列の特徴

特徴を決定した方法 S

30

40

50

THIS PAGE BLANK (USPTO)